Caffeine이 토끼의 대동맥 평활근에서의 수축에 관여하는 Ca^{2+} Pool 및 Actomyosin ATPase에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실
아주대학교 의과대학 생리학교실*
김진민 · 이영호 · 문창현* · 강복순 · 강두희

= Abstract =

Effect of Caffeine on the Ca^{2+} Pool Affecting Contractility and Actomyosin ATPase Activity in Vascular Smooth Muscle of Rabbit

Jin Min Kim, M.D., Young Ho Lee, Chang Hyun Moon, M.D.,*
Bok Soon Kang, M.D., Doo Hee Kang, M.D.
Department of Physiology, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea
Department of Physiology, Ajou University, College of Medicine, Seoul, Korea*

Caffeine has been known to induce the contraction of rabbit aortic ring resulting from Ca^{2+} release from the intracellular stores. But in contrast, contraction of aortic ring induced by depolarizing agents or agonist was reported to be suppressed by caffeine.

The present study was intended to examine the effect of caffeine on Ca^{2+} movement across the plasma membrane and actomyosin ATPase activity of vascular smooth muscle to elucidate the modes of action of caffeine on the vascular smooth muscle.

Aortic ring preparation were made from the rabbit thoracic aorta and the endothelial cells were removed from the ring by gentle rubbing. The contractilty of the aortic ring was measured under varying conditions, and Ca^{2+} influx across the membranes of the aortic ring was measured with Ca^{2+} sensitive electrode with and without caffeine and the effect of caffeine on actomyosin ATPase activity were measured by modified Hartshrone's method. ^{45}Ca wash out curves with and without caffeine were studied by Richard's method.

The results were summarized as follows :

1) Caffeine inhibited the contractilty induced by norepinephrine, high K^+, and histamine, but caffeine alone induced a transient contraction of vascular smooth muscle. The caffeine induced contraction was demonstrable even in the absence of external Ca^{2+}.

2) Caffeine increased ^{45}Ca efflux from vascular smooth muscle.

3) In the presence of propranolol, the inhibitory effect of caffeine on epinephrine induced contraction still persisted.

4) Caffeine decreased norepinephrine induced Ca^{2+} influx through the plasma membranes

of aortic ring.

5) Caffeine decreased the actomyosin ATPase activity of vascular smooth muscle.

From the above results, it is suggested that caffeine induces the contraction of vascular smooth muscle by release of Ca^{2+} from intracellular Ca^{2+} store, but inhibits drug-induced contraction by decrease of Ca^{2+} influx across the plasma membranes and a decreased Ca^{2+} sensitivity of contractile protein in vascular smooth muscle.

KEY WORDS : Caffeine · Contractility · Vascular smooth muscle.

서 론

혈관 평활근에 있어서 그 수축력과 긴장도의 크기는 수축단백질을 활성화시키는데 필요한 세포내 유리 Ca^{2+}(free Ca^{2+}) 농도와 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성에 영향을 주는 여러 요소에 의해 결정되게 된다.

세포내 유리 Ca^{2+} 농도는 혈관 평활근 세포막과 sarcoplasmic reticulum을 통해 조절되는데, 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 과정으로는 세포막전압에 의해 조절되는 voltage-gated Ca^{2+} channel[1,2,3]과 neurotransmitter hormone이나 autacoid와 같은 agonist에 의해 조절되는 receptor-operated Ca^{2+} channel[4,5]을 통한 Ca^{2+} 유입 및 second messenger에 의해 조절되는 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca^{2+} 유리[6,7,8,9] 등이 있다. 세포내 Ca^{2+} 농도를 감소시키는 과정으로는 혈관 평활근 세포막의 Ca^{2+} ATPase와 $Na^{+}-Ca^{2+}$ exchange(forward mode)를 통한 세포외로의 Ca^{2+} 유출 및 sarcoplasmic reticulum내로의 Ca^{2+}의 재진입[6] 등이 있다.

한편, 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성 또한 혈관 평활근의 수축력을 조절하는 중요한 요소임이 근래에 밝혀졌다[10,11,12]. 따라서 상기한 세포내 유리 Ca^{2+} 농도나 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성에 영향을 미치는 약물이나 자극은 바로 혈관 평활근의 수축력에 변화를 초래하게 된다.

한편, Sandow[13]는 caffeine이 개구리 골격근의 기계적 특성에 미치는 효과를 연구해 본 결과 낮은 농도(2~4mM)의 caffeine은 개구리 골격근의 연축 크기만을 증가시키나, 높은 농도(5mM 이상)의 caffeine은 경축 현상을 초래하였다. 이러한 효과는 caffeine이 sarcoplasmic reticulum으로 부터 Ca^{2+}을 유리시키기 때문이라고 보고하였다. 개구리 골격근에서와 같이 caffeine은 혈관 평활근에서도 수축을 유발하는데 이는 역시 caffeine이 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 Ca^{2+}을 유리시킨 결과라고 하였다[14,15,16]. 사실 caffeine에 의해 분리된 심근 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{2+} release channel이 활성화 된다는 것이 최근 보고되었으며, 혈관 평활근의 endoplasmic reticulum에도 동일한 효과를 나타내리라 추측하였다[17]. 이러한 실험 결과로 caffeine은 골격근, 심근 및 혈관 평활근에서 세포내 Ca^{2+} 저장소의 크기 및 기능을 연구하는데 있어서 널리 사용되고 있다.

그러나 근래에 caffeine은 가토대동맥, 내장평활근에서 탈분극 또는 receptor의 활성화에 의해 유도된 혈관 평활근의 수축을 억제한다는 것이 보고되고 있다[16,18,19]. 이러한 caffeine의 억제성 효과는 caffeine이 phosphodiesterase 활성도를 억제하여 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 축적에 따른 결과라 하였다[20,21]. 세포내 cAMP가 증가하면 intracellular Ca^{2+} store내로 Ca^{2+}의 재진입의 증가[22] 또는 myosin-light chain kinase 활성도의 억제[23] 등에 의해 혈관 평활근의 이완이 초래된다고 보고하였다. 그러므로 이와같은 caffeine에 의한 혈관 평활근 수축력의 상반된 효과는 연구자들간에 혼돈을 초래하게 되고 여기에 관련된 기전을 알기 위해서는 caffeine이 세포내 유리 Ca^{2+} 농도와 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구가 수행되어야 된다고 본다.

한편 적출된 대동맥 절편이나 대동맥환의 내피세포에서는 여러가지 혈관 수축제에 의해 유도된 혈관 수축이 acetylcholine을 위시한 여러 약물에 의해 이완이 되고, 또 endothelin을 위시한 여러 조건에 의해 수축이 되는데 이는 혈관의 내피세포에서 혈관을 이완시키는 요소(endothelium-deri-

ved relaxing factor)와 수축시키는 요소(endothelium-derived contracting factor)를 유리하여 혈관의 긴장도를 조절하기 때문인 것으로 밝혀졌다[25,26].

따라서 본 연구에서는 여러가지 약물이나 자극에 의해 혈관 내피세포에서 유리되는 endothelium-derived relaxing factor 및 endothelium-derived contracting factor의 혈관에 미치는 효과를 제거하기 위하여 적출된 가토 대동맥에서 혈관 내피세포를 제거한 혈관 평활근만의 대동맥환 표본을 만들어 caffeine이 세포막을 통한 Ca^{2+} 이동 및 actomyosin ATPase 활성도에 미치는 영향을 규명하고 아울러 혈관 평활근의 긴장도에 미치는 caffeine의 억제성 효과의 기전을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험동물로는 1.5 내지 2.0kg 내외의 가토를 암수 구별없이 사용하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용된 약물로는 norepinephrine(L-arterenol bitartrate, Sigma사 제품), acetylcholine(Sigma사 제품), caffeine(Sigma사 제품), histamine(Sigma사 제품) 및 phentolamine(Regitine, Ciba사 제품) 등이다.

2. 실험방법

1) 대동맥환의 제조

가토를 두부강타하여 희생시킨 후 흉곽을 열어 하행성 흉부대동맥을 적출하여 이를 실온에서 혼합기체(95% O_2+5% CO_2)로 포화된 Krebs-Henseleit 용액(KH용액 ; mM : NaCl, 118 ; KCl, 4.8 ; $CaCl_2$, 2.5 ; $MgSO_4$, 1.2 ; KH_2PO_4, 1.2 ; $NaHCO_3$, 24 ; glucose, 11 ; ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.03 ; pH 7.4)에 담그어 현미경하에서 혈관주위의 지방과 결체조직을 제거한 후, 이를 2~3mm 폭으로 잘라 대동맥환을 만들었고, 혈관 겸자를 혈관강에 삽입한 후 내벽을 가볍게 문질러서 내피세포(endothelial cell)가 없는 대동맥환을 만들어 실험에 사용하였다. 혈관의 내피세포 존재유무는 Furchgott등[25]의 방법으로 확인하였다. 즉, 1×10^{-6} M의 norepinephrine으로 혈관 수축을 유도하고 norepinephrine 존재하에 1×10^{-6}M의 acetylcholine을 첨가하여 수축된 혈관이 이완하면 내피세포가 존재하는것으로 간주하고, 수축된 혈관이 이완되지 않거나 오히려 더 수축이 되는 경우는 내피세포가 제거된 것으로 간주하였다.

2) 장력의 측정

대동맥환은 20ml의 muscle chamber에 담그어 L자로 된 2개의 stainless steel hook(직경 0.6mm)을 혈관강에 삽입하고, 하나의 hook의 일단은 muscle chamber의 하단에 고정하고, 다른 hook의 일단은 force transducer(Grass Model FT03)에 연결하여 혈관의 등척성 장력을 Polygraph(Grass Model 7P)에 기록하였다. 대동맥환은 혼합기체가 충분히 공급되고, 온도가 37℃로 유지되는 KH 용액의 muscle chamber에 고정시킨 후 2g의 안정 장력을 가하여 120분간 온도 및 흥분성이 일정해질 때 까지 평형을 유지시켰다(그림 1). 이 120분간의 평형 기간에 1×10^{-6}M의 norepinephrine으로 혈관 수축을 유도후 세척시키는 과정을 2 내지 3회 반복하였으며, 혈관 평활근의 수축고가 일정해졌을 때 본 실험을 시행하였다.

(1) 여러가지 혈관 수축제로 유도된 혈관 수축에 caffeine에 의한 혈관 장력 변화의 측정

Norepinephrine, 고농도 K^+ 및 histamine으로 유도된 혈관 수축에 미치는 caffeine의 효과를 살펴보기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 내피세포가 제거된 대동맥환을 37℃의 muscle chamber에서 온도, 흥분성을 평형시킨 후 혈관 수축제가 없을 때에 10mM caffeine이 혈관 평활근에 미치는 효과를 관찰하였다. 다른 한편으로 10^{-6}M의 norepinephrine, 고농도의 K^+(정상 KH 용액의 조성중 Na^+을 K^+으로 대치, 123mM K^+) 또는 histamine (50μM)을 각각 첨가하여 혈관 수축을 유도하고, 혈관 수축이 평형에 도달하였을 때 caffeine(10mM)을 첨가하여 혈관 평활근의 장력 변화를 측정하였다. 고농도의 K^+으로 혈관 수축을 유도하였을 경우에는 신경말단으로 부터 탈분극에 의한 intrinsic norepinephrine이 유리되기 때문에 이의 작용을 차단하기 위하여 phenotolamine(10^{-5}M)을 동시에

처치하였다.

(2) 세포외액의 Ca^{2+}을 제거하였을 때 caffeine에 의한 혈관 장력 변화의 측정

Caffeine에 의한 혈관 평활근의 일시적인 수축에 동원되는 Ca^{2+}의 근원을 규명하기 위하여 norepinephrine(10^{-6}M), 고농도의 K^+ 및 caffeine(10mM)으로 각각 혈관 수축을 유도하고 그 수축이 평형에 도달하였을 때 muscle chmber의 용액을 정상 KH 용액으로 바꾸어 세척한 후 30분간 incubation 하였다. 30분간 회복과정 후 정상 KH 용액을 Ca^{2+}-free, EGTA-KH용액(정상 KH 용액의 조성중 Ca^{2+}을 제거시키고 10mM EGTA를 첨가)으로 바꾸어 10분간 incubation하여 세포밖에서 유입되는 Ca^{2+}의 근원을 제거한 다음 norepinephrine, 고농도의 K^+ 및 caffeine을 각각 처치하였을 때 나타나는 혈관 평활근의 장력 변화를 측정하였다.

(3) 아드레날린성 β-수용체 봉쇄약물인 propranolol 전 처치시 caffeine에 의한 혈관 장력 변화의 측정

여러가지 수축제로 유도된 혈관 수축에 caffeine을 처치시 혈관 평활근의 이완이 나타나는데 이러한 혈관 평활근의 이완이 세포내 cAMP 축적에 기인하는 것인지를 규명하기 위하여 epinephrine(10^{-6} M)으로 혈관 수축을 유도하고 그 수축이 최고도에 도달하였을 때 caffeine(10mM)을 첨가하여 장력 변화를 관찰하였다. Caffeine에 의한 장력 변화가 일정해졌을 때 정상 KH 용액으로 바꾸어 세척한 후 60분간 incubation 하였다. 60분간 회복과정 후 0.05mM propranolol을 10분간 전 처치 한 다음 epinephrine으로 혈관 수축을 유도한 후 caffeine 처치시 나타나는 혈관 평활근의 장력 변화를 측정하여 상호 비교하였다.

3) 혈관 평활근 세포막을 통한 ^{45}Ca efflux의 측정

^{45}Ca efflux의 측정은 먼저 대동맥 절편(무게 15~20mg)을 ^{45}Ca(1μCi/ml)이 포함된 KH 용액에서 약 3시간 동안 incubation 하였다(^{45}Ca loading). 약 3시간 후 대동맥 절편에 부착된 ^{45}Ca을 세척하기 위하여 ^{45}Ca이 존재하지 않는 KH 용액에 대동맥 절편을 담구어 5초간 세척한 다음 ^{45}Ca이 존재하지 않는 KH 용액(2.5ml)이 들어있는 일련의 vial에 10분씩 담구고 그 다음으로 옮기어 120분 까지 세척하였다. 이때 aeration과 stirring의 목적으로 혼

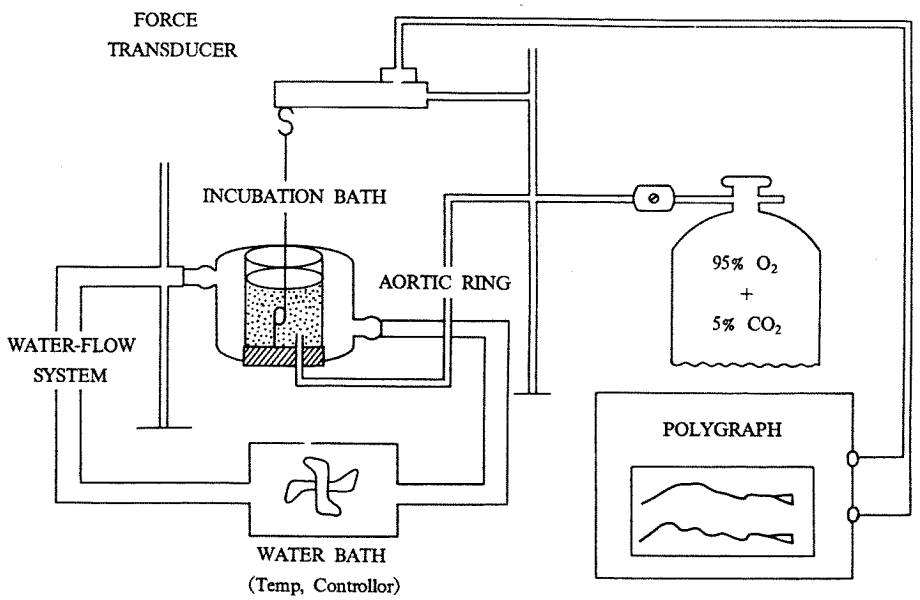


그림 1. 혈관 평활근의 장력 측정장치.
대동맥환 내에 L자의 stainless steel hook을 삽입하여 하단은 muscle chamber밑에 고정하고 상단은 force transducer에 연결하여 혈관 평활근에서 발생되는 등척성 장력을 Polygraph에 기록하였음. 실험기간 동안 chamber내의 온도는 37℃로 일정하게 유지하였고 혼합기체를 공급하였다.

합기체를 공급하였다.

Caffeine이 ^{45}Ca efflux에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 위의 실험과정을 반복하되 60분 이후의 세척액에 10mM의 caffeine을 첨가하였다.

120분간의 세척과정이 끝난 후 efflux용액에 scintillation cocktail을 1 : 10이 되게 첨가하여 균등하게 혼합한 후 ^{45}Ca 활성도를 측정하였다.

4) 혈관 평활근 세포막을 통한 Ca^{2+} 유입의 측정

(1) Ca^{2+}-selective electrode의 제작

대동맥 평활근 세포막을 통한 Ca^{2+} flux는 표면적이 약 0.7cm^2 되는 Ca^{2+}-selective electrode로 측정하였다. 이때 사용된 Ca^{2+}-selective electrode는 Ca^{2+} exchange resin[10% ETH 1001 (Fluka, Switzerand), 1% sodium tetraphenyl borate, 89% nitrophenyl-octyl-ether]를 polyvinyl chloride에 녹여서 millipore filter adapter(SX0001300 Millipore Cor. USA) 표면에 부착시켜 만들었다.

(2) 혈관 평활근 세포막을 통한 Ca^{2+} 유입의 측정

대동맥환에서 Ca^{2+} 유입의 측정은 0.05mM Ca^{2+}이 함유된 KH 용액(3ml)에서 Ca^{2+}-selective electrode를 평형시킨 후 caffeine(10mM)이 존재할 때와 존재하지 않을 때 각각 혈관 평활근과 norepinephrine(10^{-6}M)을 첨가하여 대동맥 세포내로의 Ca^{2+} 유입으로 나타나는 Ca^{2+} 농도의 감소를, 즉, 이때의 Ca^{2+} 전압(E_{Ca}) 감소를 high input impedence amplifier(AD515, Analog Device)로 측정하여 이를 chart record에 지속적으로 기록하였다(그림 2).

5) 혈관 평활근 및 골격근의 actomyosin ATPase 활성도의 측정

혈관 평활근에서 actomyosin ATPase 활성도의 측정은 먼저 분리된 혈관을 50% glycerol 용액에 담구어 37℃의 항온수조에서 90분간 incubation하여 glycerin으로 처치된 대동맥환을 얻었다. 골격근의 actomyosin은 Levy 및 Fleisher의 방법[27]으로 얻었다.

혈관 평활근 및 골격근에서 Ca^{2+}-ATPase의 측정은 Hartshrone등[28]의 방법과 유사한 방법으로 시행하였다. 즉, pCa가 각각 7, 6 및 5인 incubation 용액(mM ; KCl, 30 ; $MgCl_2$, 5 ; 변화시킨 [Ca^{2+}] ; Tris buffer pH 7.4)에 glycerine으로 처치된 대동맥환 또는 골격근에서 분리한 actomyosin을 가하여 10분간 preincubation 한 후 adenosine triphosphate를 0.5mM되게 가하여 incubation 하였다. 10분간 incubation 후 미리 냉각된 20% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 정지시킨 후 3,000×g로 20분간 원심 침전시켜 상층액에 유리된 무기인산(Pi)을 Fiske 및 SubbaRow의 방법[29]으로 측정하였다. Ca^{2+} ATPase의 활성도는 incubation 용액내에 2mM EGTA를 가한 경우의 활성도(즉, Mg^{2+}-ATPase)를 전체 활성도에서 감하여 산출하였다.

Caffeine이 actomyosin ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 위의 실험을 10mM caffeine이 존재하에 동일하게 측정하였다.

6) 자료분석 및 통계처리

혈관 평활근막을 통한 Ca^{2+} 유입 및 actomyosin ATPase 활성도의 실험결과는 평균±표준오차로 나타냈으며, 대조군과 caffeine 투여군 간의 차이는 paired t-test로 유의성을 검정하였고 p-value가 0.05 이하시 유의한 것으로 간주하였다.

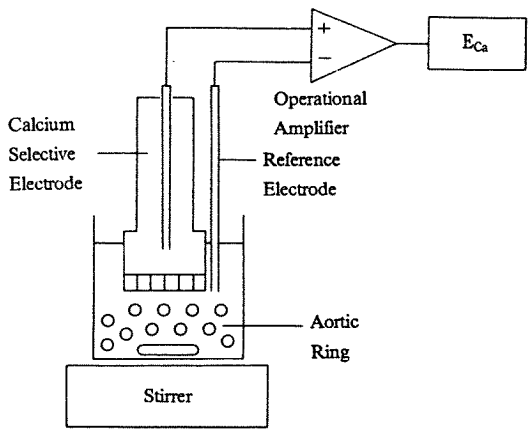


그림 2. 혈관 평활근 막을 통한 Ca^{2+} 유입의 측정. 대동맥환에서 Ca^{2+} 유입의 측정은 reaction chamber(37℃)내의 Ca^{2+} 농도 변화를 Ca^{2+}-selective electrode로 측정하여 Ca^{2+} 농도 변화에 따른 전압차 [E_{Ca}]를 chart recorder에 기록하였음.

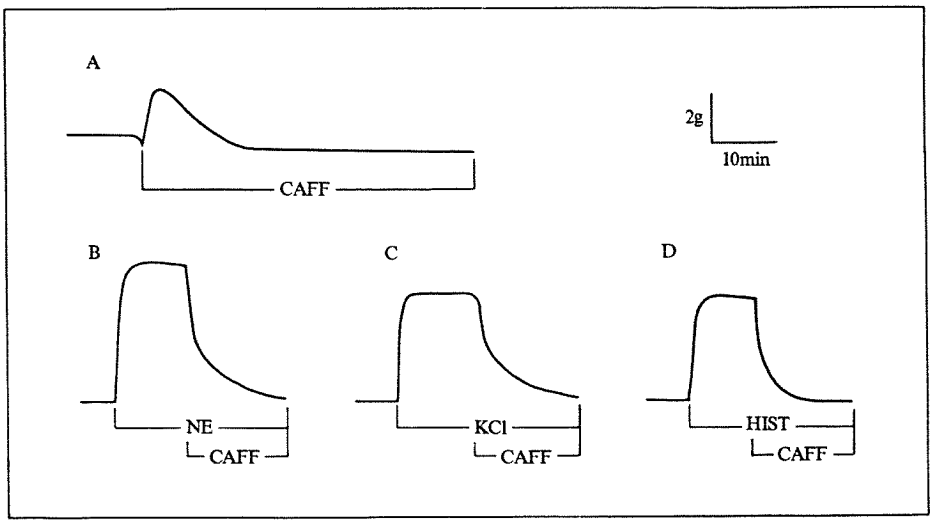


그림 3. Caffeine이 여러가지 혈관 수축제로 유도된 혈관 평활근의 수축에 미치는 영향.
여러가지 혈관 수축제로 혈관 수축을 유도한 후 caffeine 첨가시 혈관 평활근의 장력 변화를 관찰한 전형적인 기록임. A는 혈관 수축제로 혈관 수축을 유도하지 않고 caffeine만 첨가한 경우로서 일시적인 수축 후 바로 혈관 평활근의 이완이 일어났음. B, C 및 D는 각각 10^{-6}M norepinephrine(NE), 고농도의 K^+(KCl) 및 50μM histamine(HIST)으로 혈관 수축을 유도한 후 10mM caffeine(CAFF)을 첨가한 경우로서 혈관 수축제의 종류에 관계없이 모두 caffeine에 의해 혈관 평활근의 이완이 일어났다.

성 적

1. Caffeine이 여러가지 혈관 수축제로 유도된 혈관 평활근의 수축에 미치는 영향

Caffeine이 혈관 평활근의 수축력에 미치는 영향과 norepinephrine, 고농도의 K^+ 및 histamine으로 혈관 수축을 유도하였을 때 caffeine이 이들 혈관 평활근의 수축력에 미치는 영향은 그림 3에 나타낸 바와 같다. 이 그림에서 보는 바와 같이 10mM caffeine만을 처치한 경우 혈관 평활근의 일시적인 수축이 일어난 후 바로 이완이 일어나고 이러한 이완은 caffeine 처치전 기초장력 상태보다 더욱 더 이완되었다(그림 3의 A). 그러나, 주로 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 유리되는 Ca^{2+}에 의존하여 혈관 평활근의 수축을 일으키는 것으로 알려진 norepinephrine(그림 3의 B)과 주로 혈관 평활근 막을 통해서 유입되는 Ca^{2+}에 의존하여 혈관 평활근의 수축을 일으키는 것으로 알려진 고농도의 K^+(그림 3의 C) 및 histamine(그림 3의 D)으로 혈관 수축을 유도한 후 caffeine을 가하였을 때 caffeine은 모든 경우에서 혈관 평활근을 기초상태로 완전히 이완시켰다. 즉, 이때 10mM caffeine은 혈관 평활근의 수축에 억제성 효과를 나타내며, 이러한 효과는 그 반응이 매우 빠르며 혈관 평활근 수축제의 종류에 관계없이 나타났다.

2. Caffeine이 세포외액의 Ca^{2+}을 제거하였을 때 혈관 평활근의 긴장도에 미치는 영향

Caffeine 단독 투여시 나타나는 혈관 평활근의 일시적인 수축에 동원되는 Ca^{2+}의 근원을 규명하기 위하여 실험한 결과는 그림 4에 나타낸 바와 같다. 이 그림에서 보는 바와 같이 먼저 주로 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 유리되는 Ca^{2+}에 의존하여 혈관 평활근의 수축을 일으키는 것으로 알려진 norepinephrine의 경우(그림 4의 A) Ca^{2+}-free, EGTA-KH용액으로 10분간 전 처치하여 세포외액으로 부터 유입되는 Ca^{2+}의 근원을 차단한 상태에서도 혈관 평활근의 수축력은 부분적으로 억제될 뿐 여전히 norepinephrine에 의해 혈관 평활근의 수축이 일어나나, 주로 혈관 평활근 막을 통해서 유입되는 Ca^{2+}에 의존하여 혈관 평활근의 수축을 일으키는 것으로 알려진 고농도의 K^+(그림 4의 B)의 경우 같은 전 처치로서 혈관 평활근의 수축이

완전히 억제됨을 알 수 있었다.

Caffeine의 경우(그림 4의 C) norepinephrine과 유사하게 Ca^{2+}-free, EGTA-KH용액으로 10분간 전처치한 경우에도 혈관 평활근의 수축의 크기는 감소하나 수축 양상은 동일함을 알 수 있었다.

이 때 유도되는 혈관 평활근의 수축은 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 유리되는 Ca^{2+}에 의존적이므로 caffeine에 의한 혈관 평활근의 일시적인 수축은 caffeine이 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 Ca^{2+}을 유리시켜 일어난 결과로 생각된다.

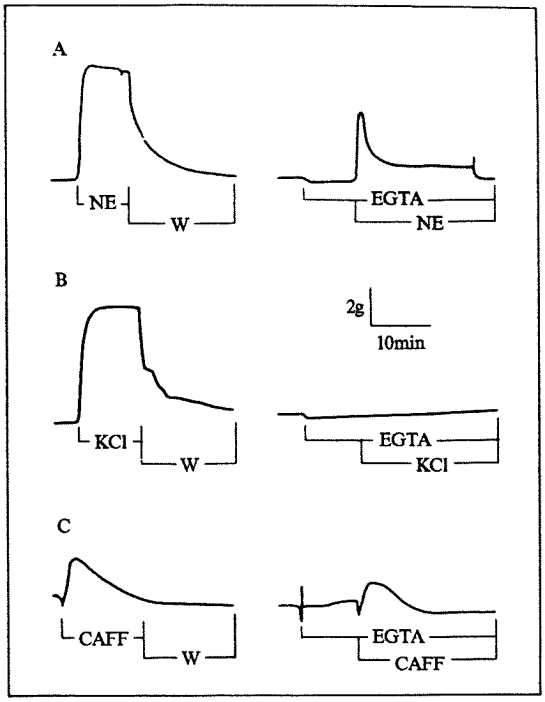


그림 4. Caffeine이 세포외액의 Ca^{2+}을 제거하였을 때 혈관 평활근의 긴장도에 미치는 영향.
10mM EGTA의 10분간 전 처치가 10^{-6}M norepinephrine(NE, 그림 A), 고농도의 K^+(KCl, 그림 B) 및 10mM caffeine(CAFF, 그림 C)으로 유도된 혈관 평활근의 등척성 장력에 미치는 영향을 관찰한 전형적인 기록임. Norepinephrine 및 caffeine의 경우 10mM EGTA가 존재할 때도 여전히 혈관 평활근의 수축이 일어났으나 고농도의 K^+의 경우 10mM EGTA가 존재할 때 혈관 평활근의 수축이 일어나지 않았다.
W : 정상 KH용액으로 세척

3. Caffeine이 혈관 평활근 막을 통한 ^{45}Ca efflux에 미치는 영향

Caffeine에 의한 혈관 평활근의 일시적인 수축에 동원되는 Ca^{2+}의 근원을 규명하기 위한 다른 하나의 방법으로 caffeine이 혈관 평활근 막을 통한 ^{45}Ca efflux에 미치는 영향을 관찰한 결과는 그림 5에 나타낸 바와 같다. 이 그림에서 보는 바와 같이 ^{45}Ca(1μ Ci/ml)를 함유한 정상 KH 용액에 3시간 동안 incubation한 대동맥 절편은 전형적인 ^{45}Ca 세척곡선을 나타내고, efflux 60분 후에 caffeine을 첨가한 경우 efflux는 증가되고 그 증가는 10분내에 최고도를 나타내었다.

이 실험 결과 역시 caffeine이 세포내 Ca^{2+} 저장

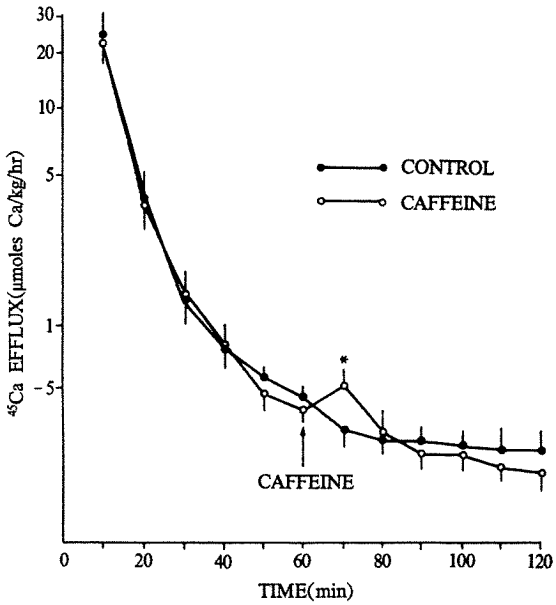


그림 5. Caffeine이 혈관 평활근 막을 통한 ^{45}Ca efflux에 미치는 영향.
혈관 평활근으로 부터 ^{45}Ca efflux에 caffeine의 영향을 관찰하였음. 혈관 평활근을 ^{45}Ca이 함유된 정상 KH 용액에 3시간 동안 incubation한 후 efflux를 측정하기 위하여 2.5mM Ca^{2+}이 함유된 용액에 10분 간격으로 세척하였음(CONTROL). Caffeine군(CAFFEINE)은 efflux 60분 후에 caffeine을 첨가하여 그 효과를 관찰한 것으로 이때 의의있게(*) efflux를 증가시켰다. 각 값은 실험예수 6의 평균±표준오차임.
* ; $p<0.05$(대조군과 비교하였을 경우)

소로 부터 Ca^{2+}을 유리시킨다는 실험적 증거로 생각된다.

4. Caffeine이 아드레날린성 β-수용체 봉쇄약물인 propranolol을 전 처치한 혈관 평활근의 장력 변화에 미치는 영향

여러가지 수축제로 유도된 혈관 수축에 caffeine을 처치시 혈관 평활근의 이완이 나타나는데 이러한 혈관 평활근의 이완이 세포내 cAMP의 축적에 기인하는 것인지를 규명하기 위하여 실험한 결과는 그림 6에 나타낸 바와 같다. 이 그림에서 보는 바와 같이 먼저 epinephrine으로 혈관 평활근의 수축을 유도한 후 caffeine을 첨가시 혈관 평활근의 긴장도는 기초상태로 완전히 이완되었다. 60분간의 회복과정 후 아드레날린성 β-수용체 봉쇄약물인 propranolol을 전 처치한 후 epinephrine을 첨가시 혈관 평활근의 수축이 일어나는데 이 때 일어나는 수축의 크기는 propranolol을 처치하지 않은 경우보다 다소 증가하였다. Epinephrine에 의한 혈관 평활근의 수축이 일정해졌을 때 caffeine을 첨가시 혈관 평활근의 이완이 일어나는데 이 이완 정도는 propranolol을 처치하지 않은 경우와 유사하였다.

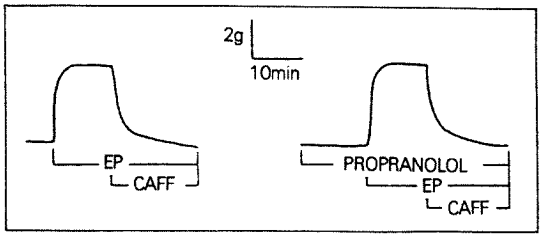
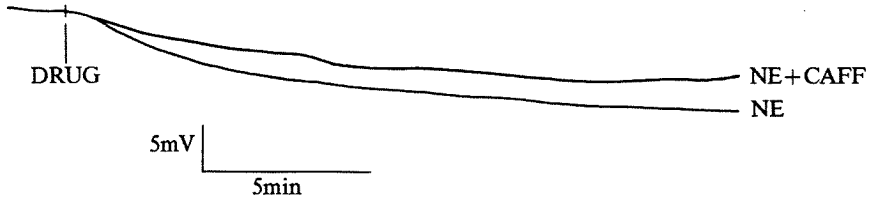


그림 6. Caffeine이 아드레날린성 β-수용체 봉쇄약물인 propranolol을 전 처치한 혈관 평활근의 장력에 미치는 영향.
10^{-6}M epinephrine(EP)으로 혈관 수축을 유도한 후 10mM caffeine(CAFF) 첨가시 나타나는 혈관 평활근의 장력 변화에 β-수용체 봉쇄약물인 propranolol의 전 처치가 미치는 영향을 관찰한 전형적인 기록임. Propranolol을 전 처치하여도 caffeine에 의한 혈관 평활근의 이완 정도는 변화하지 않았음.

즉, cAMP의 생성이 propranolol에 의하여 감소되었을 터인데 caffeine의 효과에는 별 영향이 없는 것으로 보아 caffeine의 억제성 효과는 cAMP 축적에 의한것 보다는 다른 기전에 의존할 것으로 생각된다.

5. Caffeine이 혈관 평활근 막을 통한 Ca^{2+} 유입에 미치는 영향

여러가지 혈관 수축제로 유도된 혈관수축에 caffeine의 억제성 효과가 Ca^{2+}의 유입을 감소시켜서 일어난 결과인지 확인하기 위하여 caffeine이 혈관 평활근 막을 통한 Ca^{2+}의 유입에 미치는 영향을 실험한 결과는 그림 7에 나타낸 바와 같다. 이 그림에서 보는 바와 같이 norepinephrine을 첨가한



Treatment	Amount of Ca^{++} influx	
	μmoles/mg. wet tissue/5min	μmles/mg. wet tissue/20min
NE	5.34 ± 1.29	16.58 ± 3.12
NE + CAFF	2.25 ± 0.93*	8.69 ± 2.33*

그림 7. Caffeine이 혈관 평활근 막을 통한 Ca^{2+} 유입에 미치는 영향.
위의 그림은 caffeine이 혈관 평활근 막을 통한 Ca^{2+} 유입에 미치는 영향을 관찰한 전형적인 기록이다. 0.05mM Ca^{2+}이 함유된 KH용액에 Ca^{2+}-selective electrode를 평형시킨 후 대동맥환과 10^{-6}M norepinephrine(NE)을 단독 또는 10mM caffeine(NE+ CAFF)을 함께 첨가하여 Ca^{2+} 유입을 측정한 기록으로, caffeine에 의해 Ca^{2+} 유입이 감소되었다. 아래의 표는 초기 5분 까지의 유입된 Ca^{2+}의 양과 20분 까지의 Ca^{2+}의 양을 E_{Ca}로 부터 계산한 값이다. 각 값은 평균±표준오차(실험예수 6)로 나타내었음.
* ; $p<0.05$(norepinephrine 단독 투여시와 비교시), CAFF ; caffeine

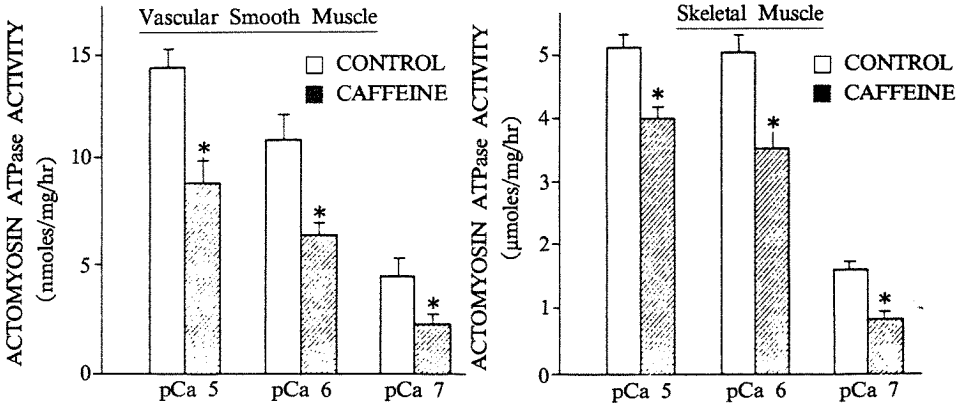


그림 8. Caffeine이 혈관 평활근 및 골격근의 actomyosin ATPase 활성도에 미치는 영향.
혈관 평활근 및 골격근의 actomyosin에서 각각 pCa가 7, 6 및 5인 용액에서 caffeine(10mM)이 actomyosin ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰한 것으로 caffeine이 actomyosin ATPase 활성도를 감소시켰다. 각 값은 평균±표준오차(실험예수 7)로 나타내었음.
*; $p<0.05$(대조군의 값과 비교시)
pCa; negative logarithm of free Ca^{2+} concentration

20분 후 조직을 통한 Ca^{2+}의 유입이 16.58±3.12 μmoles/mg, wet tissue/20min였으며, caffeine을 첨가하였을 때에는 같은 기간 동안 Ca^{2+} 유입이 8.69 ±2.33μmoles/mg, wet tissue/20min로서 대조군에 비하여 Ca^{2+} 유입이 현저하게 감소하였다.

따라서 caffeine이 Ca^{2+}의 유입을 감소시키는 것이 여러가지 혈관 수축제로 유도된 혈관 수축에 caffeine이 억제성 효과를 나타내는 하나의 기전으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

6. Caffeine이 혈관 평활근 및 골격근의 actomyosin ATPase 활성도에 미치는 영향

Caffeine이 수축억제 효과에 대한 다른 하나의 기전으로 caffeine이 혈관 평활근의 수축기구인 actin과 myosin의 Ca^{2+}에 대한 감수성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 caffeine이 혈관 평활근의 actomyosin ATPase 활성도에 미치는 영향을 실험한 결과는 그림 8에 나타낸 바와 같다. 이 그림에서 보는 바와 같이 actomyosin ATPase의 활성도는 pCa 7, 6 및 5에서 대조군은 각각 4.5±0.97, 10.9±1.30 및 14.4±0.91(nmoles/mg, wet tissue/hr)이었고, caffeine 첨가군은 각각 2.26±0.42, 6.33±0.53 및 8.9±1.04(nmoles/mg, wet tissue/hr)로서 두군 모두 incubation 용액내 Ca^{2+}의 농도가 감소함에 따라 actomyosin ATPase 활성도가 감소하였고, 같은 Ca^{2+} 농도에서 caffeine 첨가군의 actomyosin ATPase 활성도가 대조군에 비해 의의있게 감소하였다. 골격근에서 분리된 actomyosin ATPase도 같은 양상을 나타내었다.

따라서 caffeine이 actomyosine ATPase 활성도 즉, 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성을 감소시키는 것이 caffeine의 억제성 효과의 또 다른 기전으로 작용할 수 있으리라 생각된다.

고 찰

Caffeine은 골격근에서 sarcoplasmic reticulum으로 부터 Ca^{2+}을 유리시켜 근육의 수축을 초래하므로 세포내 Ca^{2+} 저장소의 크기 및 기능을 연구하는데 있어서 널리 사용되고 있는 약물이다. 즉, Sandow[13]는 caffeine이 개구리 골격근에서 낮은 농도(2~4mM)의 caffeine은 개구리 골격근의 연축 크기만을 증가시키고 높은 농도(5mM 이상)의 caffeine은 경축 현상을 초래시키는데 이는 caffeine이 sarcoplasmic reticulum으로 부터 Ca^{2+}을 유리시키기 때문이라고 보고하였다. 또한 caffeine 단독 투여시는 혈관 평활근에서도 수축을 유발하는데 이 또한 caffeine이 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 Ca^{2+}을 유리시킨 결과라고 하였다[14,15,16].

이와는 달리 탈분극 또는 혈관 수축제에 의해 유도된 가토 혈관 평활근의 수축이 caffeine에 의해

억제된다는 것이 최근 보고되었는데[16,18,19] 이의 기전으로 caffeine이 phosphodiesterase 활성도를 억제하여 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 축적에 따른 결과라고 하였다[20,21]. 이와같이 caffeine의 투여 방법에 따라 혈관 평활근의 긴장도에 미치는 영향이 서로 다르게 나타나나 그 기전은 아직 명확하게 밝히지 못하였다.

본 실험에서도 역시 이러한 caffeine의 상반된 효과가 나타났다. 즉, caffeine 단독은 혈관 평활근의 일시적인 수축을 유발하는데 반하여 norepinephrine, 고농도의 K^+ 및 histamine과 같은 여러 혈관 수축제로 유도된 혈관 수축이 caffeine에 의해 완전히 이완되었다(그림 3).

따라서 본 실험에서는 적출한 가토 대동맥에서 내피세포를 제거한 혈관 평활근만의 대동맥환 표본을 만들어 caffeine이 세포내 Ca^{2+} pool 및 actomyosin ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰하여 혈관 평활근의 긴장도에 대한 caffeine의 작용기전을 규명하고자 하였다.

먼저 caffeine에 의한 혈관 평활근의 일시적인 수축에 동원되는 Ca^{2+}의 근원을 규명하기 위해 실험한 결과(그림 4) Ca^{2+}-free, EGTA(10mM)가 함유된 KH용액으로 처치하여 세포외액으로 부터 유입될 수 있는 Ca^{2+}을 제거하였을 경우에도 caffeine은 혈관 평활근의 일시적인 수축을 유발함으로서 다른 연구자들의 보고[15,16]와 동일하게 caffeine이 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 Ca^{2+}을 유리시켜 혈관 평활근의 수축을 일으킨다는 것을 입증할 수 있었다. 또한 caffeine이 Ca^{2+} pool에 미치는 영향을 관찰하기 위한 다른 하나의 방법으로 ^{45}Ca efflux 실험을 해본 결과(그림 5) 60분 이후의 세척액에 caffeine을 첨가한 경우에서 대조군에 비해 ^{45}Ca efflux가 증가하였다. 이런 ^{45}Ca 세척곡선을 Riggs[30]의 방법에 준하여 compartment analysis를 시행해 본 결과 60분 이후에 세척되는 Ca^{2+}은 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 유리되는 Ca^{2+}임을 확인할 수 있었다. 따라서 두 실험 결과로 caffeine은 세포내 Ca^{2+} 저장소, 특히 sarcoplasmic reticulum으로 부터 Ca^{2+}을 유리시켜 혈관 평활근을 수축시킴을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 caffeine이 분리된 심근 및 혈관 평활근의 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{2+} release channel을 활성화 시킨다는 Roussean 및 Meissner의 보고[17]와 일치한다.

Caffeine은 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 Ca^{2+}을 유리시키는 작용에도 불구하고, caffeine 단독 투여와는 달리 여러가지 혈관 수축제로 혈관 수축을 유도한 후 caffeine을 투여하는 경우 그 수축이 이완되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 3). 이같은 이완작용의 기전으로 Kroeger등[20]은 caffeine이 phosphodiesterase 활성도를 억제하여 cAMP의 축적을 초래한다고 보고하였다. 즉, 세포내 cAMP가 축적되면 myosin-light chain kinase 활성도의 억제[23,24] 또는 막계의 Ca^{2+}-pump의 활성화[22]등에 의해 혈관 평활근의 이완이 초래될 수 있다. 따라서 본 실험에서도 caffeine의 억제성 효과가 세포내 cAMP의 축적에 기인하는 지를 규명하기 위해 혈관 평활근의 α,β-adrenergic receptor에 동시에 작용하는 epinephrine을 처치하여 β-receptor 활성화에 따른 cAMP가 축적된 상태에서 caffeine에 의한 혈관이완의 크기를 보았고, 또 β-adrenergic blocking drug인 propranolol을 전 처치한 후 epinephrine을 처치하여 세포내 cAMP 축적을 방지한 상태에서 caffeine이 혈관 평활근을 이완시키는 크기를 비교해 본 결과 의의있는 차이를 관찰하지 못하였다. 따라서 caffeine에 의한 억제 효과는 세포내 cAMP 축적에 기인하는 것은 아닌 것으로 사료된다. 이같은 결과는 다른 연구자의 보고[16]와 일치한다.

한편, Meisheri 및 van Breemen[31]는 caffeine이 norepinphrine 또는 고농도의 K^+으로 증가된 Ca^{2+} 유입을 억제한다고 보고하였다. 이에 본 실험에서 caffeine의 억제성 효과의 기전으로 혈관 수축제에 의해 증가된 Ca^{2+} 유입의 감소에 기인하는 것인지를 관찰해 본 결과 caffeine은 혈관 평활근에서 norepinephrine으로 유도된 혈관 평활근 막을 통한 Ca^{2+} 유입을 현저히 감소시켰다(그림 7). 따라서 caffeine의 억제성 효과는 부분적으로 caffeine이 혈관 수축제로 유도된 혈관 평활근 막을 통한 Ca^{2+} 유입을 감소시킴으로서 일어날 것이라 추측된다.

혈관 평활근의 수축력과 긴장도의 크기를 결정하는 인자로서 수축단백질을 활성화 시키는데 필요한 세포내 Ca^{2+} 농도이외에 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성 또한 중요한 요소로서 작용한다[10,11,12]. 따라서 caffeine의 억제성 효과와 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성의 연관성을 규명하고자 하였

다. 본 실험에서는 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성을 확인할 수 있는 방법으로서 actomyosin ATPase 활성도를 측정하였는데 혈관 평활근의 actomyosin 분획을 50% glycerol로 처치하여 Ca^{2+} 농도가 각각 10^{-7}, 10^{-6} 및 10^{-5}M인 용액에서 actomyosin ATPase를 측정해 본 결과 caffeine 처치시 actomyosin ATPase 활성도가 모든 용액에서 대조군에 비해 의의있게 감소하였다(그림 8). 본 실험에서 사용한 표본이 순수 actomyosin 분획임을 확인할 수 없으므로 순수 actomyosin 분획을 분리할 수 있는 골격근에서 동일하게 실험해 본 결과 혈관 평활근에서와 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 caffeine의 억제성 효과는 caffeine이 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성을 감소시킴으로서 일어날 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 caffeine은 혈관 평활근에서 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 Ca^{2+}을 유리시켜 일시적인 수축을 일으키나, 혈관 평활근에는 세포내 Ca^{2+} 저장소가 빈약할 뿐 아니라 caffeine이 혈관 평활근 막을 통한 Ca^{2+} 유입의 감소 및 수축단백질의 Ca^{2+}에 대한 감수성을 감소시켜 여러가지 혈관 수축제로 유도된 혈관 평활근의 수축을 이완시키는 것으로 생각된다.

요 약

가토 대동맥 평활근에서 caffeine이 세포막을 통한 Ca^{2+} 이동 및 actomyosin ATPase 활성도에 미치는 영향을 규명하고 아울러 혈관 평활근의 긴장도에 caffeine의 억제성 효과의 기전을 규명하고자 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Caffeine은 norepinephrine, 고농도의 K^+ 및 histamine으로 유도된 혈관 평활근의 수축을 이완시켰으며, caffeine을 단독 투여시는 혈관 평활근을 일시적으로 수축시킨 후 바로 이완시켰다.

2) Caffeine은 세포 외액의 Ca^{2+} 근원을 차단하였을 경우에도 여전히 혈관 평활근의 일시적인 수축을 유발하였다.

3) Caffeine은 ^{45}Ca efflux를 증가시켰다.

4) 아드레날린성 β-수용체 봉쇄약물인 propranolol을 전 처치한 혈관 평활근에서 caffeine에 의한 억제성 효과는 여전히 존재하였다.

5) Caffeine은 norepinephrine에 의한 혈관 평활근막을 통한 Ca^{2+} 유입을 감소시켰다.

6) Caffeine은 혈관 평활근 및 골격근의 actomyosin ATPase 활성도를 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 caffeine은 혈관 평활근에서 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터 Ca^{2+}을 유리시켜 일시적인 수축을 일으키나, caffeine이 혈관 평활근막을 통한 Ca^{2+} 유입 및 수축기구의 Ca^{2+}에 대한 감수성을 감소시켜 여러가지 혈관 수축제로 유도된 혈관 평활근의 수축을 이완시키는 것으로 생각된다.

References

1) Bean BP, Sturek M, Pugg A, Hermsmeyer K : *Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries : modulation by dihydropyridine drugs. Cir Res 59 : 229-235, 1986*

2) Benham CD, Hess P, Tsien RW : *Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-single channel recording. Cir Res 61(Suppl I) : I10-I16, 1987*

3) Yatani A, Scidel CL, Allen J, Brown AM : *Whole-cell and single channel calcium currents of isolated smooth muscle cells from saphenous vein. Cir Res 60 : 523-533, 1987*

4) Bolton TB : *Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. Physiol Rev 59 : 606-718, 1979*

5) Morgan JP, Morgan KG : *Stimulus-specific part of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. J Physiol 351 : 116-122, 1984*

6) Bond M, Kitazawa T, Somlyo AV : *Release and recycling of calcium by the sarcoplasmic reticulum in guinea pig portal vein smooth muscle. J Physiol 355 : 677-695, 1984*

7) Nabika T, Velletri PA, Lovenberg W, Beaven MA : *Increase in cytosolic calcium and phosphoinositide metabolism induced by angiotensin II and [arg]vasopressin in vascular smooth muscle. J Biol Chem 260 : 4661-4670, 1985*

8) Somlyo AV, Somlyo AP : *Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Terap 159 : 129-145, 1985*

9) Hashimoto T, Hirata M, Ieoh T, Kanamura Y, Ku-

riyama H : *Inositol 1, 4, 5-trisphosphate activates pharmacological coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. J Physiol 370 : 605-618, 1986*

10) Blinks JR, Endoh M : *Modification of myofibrillar responsiveness to calcium is an inotropic mechanism. Cir 73(Suppl III) : 85-98, 1986*

11) Brenner B : *The cross-bridge cycle in muscle. Mechanical, biochemical, and structural studies on single skinned rabbit psoas fiber to characterize cross-bridge kinetics in muscle for correlation with the actomyosin ATPase in solution. Basic Res Cardiol 81(Suppl I) : 1-15, 1986*

12) Ruegg JC : *Calcium in muscle activation. Berlin, Springer Verlag, 1987*

13) Sandow A : *Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Pharmacol Rev 17 : 255-320, 1965*

14) Axelsson J, Hogberg SGR : *Effect of caffeine on electrical and mechanical activity of smooth muscle. Acta Pharmacol Toxicol 25(Suppl 4) : 53-61, 1967*

15) Endo M : *Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol Rev 57 : 71-108, 1977*

16) Leitjen PAA, van Breemen C : *The effect of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in rabbit aorta. J Physiol 357 : 327-329, 1984*

17) Roussean E, Meissner G : *Single cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel activation by caffeine. Am J Physiol 256 : H328-H333, 1989*

18) Ahn HY, Karaki H, Urakawa N : *Inhibitory effects of caffeine on contraction and calcium movement in vascular and intestinal muscle. Br J Pharmacol 93 : 267-274, 1988*

19) Sato K, Ozaki H, Karaki H : *Multiple effects of caffeine on contraction and cytosolic free calcium levels in vascular smooth muscle of rat aorta. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 338 : 443-448, 1988*

20) Kroeger EA, Marshall JM, Bianchi CP : *Effect of isopreterenol and D-600 on calcium movement in rat myometrium. J Pharmacol Exp Therap 193 : 309-316, 1975*

21) Schied CR, Honeyman TW, Fay FS : *Mechanism of β-adrenergic relaxation of smooth muscle. Nature 277 : 32-36, 1979*

22) Saida K, van Breemen C : *Cyclic AMP modulation of adrenoreceptor mediated arterial smooth muscle contraction. J Gen Physiol 84 : 307-318, 1984*

23) Aldelstein RS, Conti MA, Hathaway DR, Klee CB : *Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by catalytic subunit of adenosiin 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. J Bio Chem 253 : 8347-8350, 1978*

24) Kerrick WGL, Hoar PE : *Inhibition of smooth muscle tension by cyclic AMP-dependent protein kinase. Nature 292 : 253-255, 1981*

25) Furchgott RF, Zawadzki JV, Cherry PD : *Vasodilation : In Vanhoutte PM and Laise I, eds. Role of endothelium in the vasodilation responses to acetylcholine. New York Raven Press, pp49-66, 1981*

26) Furchgott RF : *The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. Trends Pharmacol Sci 2 : 173-176, 1981*

27) Levy HM, Fleisher M : *Studies on the superprecipitation of actomyosin suspensions as measured by the change in turbidity. 1. Effects of ATP concentration and temperature. Biochem Biophys Acta 100 : 471-479, 1965*